

动物克隆的理论与实践

李裕强, 张涌

(西北农林科技大学动物科学与动物医学学院, 陕西杨陵 712100)

S814.8

Q785

[摘要] 动物机体的大部分分化细胞具备全能性, 成熟卵母细胞胞质中 mRNA、蛋白质等母型信息能使注入其中的细胞基因发生再程序化, 从而启动新个体的发育。供体细胞和受体卵母细胞的周期和功能状态的同步协调是实现重构胚正常发育的关键。克隆动物的成功受供体细胞、受体卵母细胞以及二者之间的相互作用等多个因素的影响, 其中的许多规律还未被掌握, 动物克隆的研究必将揭示这些生物学规律, 显示其巨大的科学意义。

[关键词] 动物克隆; 核移植; 核质互作; 细胞全能性

[中图分类号] S814.8 **[文献标识码]** A

克隆绵羊“多莉”的诞生^[1]标志着复制动物从科学幻想变成现实, 因而曾在世界上引起一场风暴, 甚至被质疑。克隆小鼠^[2]和克隆牛^[3,4]相继获得成功, 表明体细胞克隆动物是完全可以实现的。动物克隆技术有着广阔的应用前景和巨大的社会效益, 各国科学界都十分重视。目前动物克隆的研究重点已转移到如何提高成功率并尽快使其产生效益上, 如复制转基因动物、扩大珍稀动物的种群等。我国科学家已在克隆大熊猫的研究中取得可喜进展^[5]。尽管如此, 动物克隆毕竟是一项新发展的技术, 人们对它的认识仍存在许多的迷惑和疑问, 动物克隆究竟是怎么一回事? 复制动物走向实践的路到底有多远? 本文在理论依据和技术可行性上评述了上述问题, 并对进行动物克隆需要解决的主要问题及人们目前的认识程度作了说明, 指出对动物克隆进行研究, 除了有其本身的应用前景外, 还有巨大的科学意义。

1 动物克隆的理论依据

动物的组织细胞处在各种形态级别的分化状态, 执行各自特异的生物功能, 只有具备全能性, 才可用作克隆动物。所谓全能性是指细胞包含个体的全套遗传信息, 并在特定环境因素的调节下, 可回到受精卵一样的状态, 并从头开始发育成一个完整的生物个体。生物体细胞的全能性已被许多实践所证实。1958年 Steward 用胡萝卜的单个细胞和小细胞团在离体组织培养时得到了新植株, 此后广泛的研究结果表明, 几乎植物体上所有部分的组织细胞均可通过诱导再生新植株, 也就是说植物体的每个生活细胞都具有遗传全能性 (totipotency)^[6]。细胞是生命的最小功能单位, 就其而言, 植物和动物是统一的, 因而动物细胞也应该是具有全能性的。细胞生物学的研究结果也是支持这一点的。低等动物的细

[收稿日期] 1999-01-19

[基金项目] 国家自然科学基金重点项目 (39830280)

[作者简介] 李裕强 (1969—), 男, 助理研究员

胞具有全能性,任何一个细胞都能再生成完整个体^[6]。60~70 年代,Gurdon 等^[7,8]用爪蟾蝌蚪的肠上皮细胞和体外短期培养的完全分化成熟的体细胞进行核移植分别获得成体爪蟾和蝌蚪,证实在两栖类,已分化细胞的基因组具有结构上的完整性和功能上的全能性。现已证明,高等动物的大部分细胞核完整地保存着源于卵子和精子细胞核的全套遗传信息,所谓分化只是特异基因在细胞发育进程中,根据所处的三维环境的差异而选择表达的结果。中国学者的全息胚学说^[9]在理论上对这种生物体细胞的全能性给予总结:生物体上任何一个在结构和功能上具有相对明确边界和相对内部完整性的相对独立部分,都是由体细胞向着新个体发育的某个阶段上的胚胎。这种胚胎生活在亲体这样的天然培养基上,在自主发育的同时发生了特化。这样的胚胎包含着整个部位的信息,即全息胚,细胞是全息胚的特例。

Gurdon 的试验^[7,8]亦表明,体细胞核的分化是可逆的,在适当条件下,仍能被调整恢复到分化的最初状态,并重新指导发育成一个新个体。在动物界广泛存在的再生过程中,邻近缺损部位的组织细胞首先发生去分化,发生一系列显著的变化后,再分化形成修补组织,这种现象也是细胞可逆性存在的有力证明。选择合适的调节方式,并使细胞本身处在可调节状态,是实现细胞可逆性的两个关键环节。目前看来,调节细胞核恢复到发育零状态的最佳微环境是卵母细胞质^[10],而非原核期受精卵的细胞质^[11,12]。这是因为,在卵母细胞的成熟过程中,可产生并贮存许多用于调控早期胚胎发育的因子。这些母性信息主要以 mRNAs 和蛋白质的形式存在。在合子型基因激活之前,母型 mRNAs 在发育调控中发挥着核心作用,这期间,胚胎的特定发育事件总是依赖于母性 mRNAs 的适时激活、表达、定位及消失。这些细胞质因子对指导移入细胞的染色体再构和基因组的活化是必需的,而在受精后的合子中它们可能降解或结合到 DNA 上^[13]。施主细胞的活动状态也影响卵母细胞对它进行完善的可逆性调节。近年来的研究^[14~16]表明,细胞处在 G_1 期和静止状态(G_0 期)便于卵母细胞的调节。在动物的生命过程中,绝大部分组织细胞需不断的增殖更新,这个过程就是细胞周期。细胞在进入周期的 G_1 期后,趋向有 3 种:一是进入增殖周期,处于连续分裂状态,称周期中细胞;二是离开细胞周期,进入静止期(G_0 期);三是向终端分化方向发展,行组织特异功能,这种细胞在特殊条件下(例如再生)也可转化进入增殖周期。这表明,机体组织的细胞并非全部处在特化的功能状态,而是根据条件在这 3 种状态之间相互转化。指数生长期的体外培养细胞为增殖周期中的细胞,可用血清饥饿等方法使其离开 G_1 期进入 G_0 期。这些细胞在一定刺激下可重新进入增殖周期或分化成其他细胞类型。

2 动物克隆的技术可行性

克隆动物的方法是通过细胞核移植技术,把一个完整的细胞注射进去核的卵母细胞内,用电脉冲或其他方法使二者融合并激活卵母细胞质;这个组装胚经短期培养后或直接移植到寄母的生殖道中进行发育并出生。组装胚的全套遗传信息由注入的细胞提供,最终获得的个体是提供细胞的动物的复制体,二者具有完全相同的遗传物质。

核移植方法是 50 年代美国科学家在研究两栖类细胞发育潜能性工作中创造的。60 年代,英国科学家 Gurdon 等以蝌蚪体细胞为核供体,用此方法获得成熟爪蟾^[7]。80 年代初有未被重复的核移植小鼠的报道^[17]。胚细胞核移植首先在绵羊上获得成功^[10]。随后,国

内外先后在牛^[18]、兔^[19]、猪^[20]、山羊^[21]等动物上取得卵核移植的成功。进入90年代,在牛^[22](国外)和山羊^[23](国内)上成功地进行了连续核移植。1993年,用培养扩增的内细胞团细胞核移植后产出了牛^[24]。1996年,用培养绵羊的胚盘细胞作为供体取得了核移植绵羊^[17]。1997年用培养的乳腺细胞核移植得到体细胞克隆绵羊^[1]。在此期间,在各种动物上还进行了大量以提高核移植效率为目的的研究,在生物学机理的认识和技术手段的改进上都取得了长足的进展。但总体来说,核移植,尤其是利用体细胞进行核移植目前仍处在探索阶段,人们对其中所涉及的生物学规律及其影响因素的认识还十分有限。

3 动物克隆存在的问题

成功地获得一只克隆动物,需有效地完成下述过程:施主细胞的选择和处理、寄主卵母细胞的获得与处理、显微取核和注射细胞、核质融合和卵母细胞激活、重构胚的体外培养以及胚胎移植和体内发育。目前,超数排卵或体外成熟培养技术相对比较完善,只要有足够的母体动物或卵巢资源,可基本获得足够的正常成熟卵母细胞,显微操作和胚胎移植等只是技术熟练程度的问题。克隆动物的难点在于如何避免对施主细胞DNA的损伤,保持其二倍体核型,实现正常的基因组再程序化,这些因素对重构胚的发育有着决定性意义。这一问题实际上也就是选择合适的施主细胞和实现核质同步协调性的问题。目前的实践还远未得出它的完整答案。

体细胞毕竟是已分化的细胞,虽然从理论上讲,机体中的每一个细胞都是从受精卵分裂分化而来的,通过半保留复制方式,DNA信息被完整的传递下来,但从一个受精卵到机体的亿万个细胞,有些细胞的个别基因可能发生不可逆的丢失或重排。分化细胞核内遗传信息在结构上的这种不可逆的改变,使它不可能再指导一些独特类型细胞的分化,致使发育失败。这样的细胞不具备发育的全能性,不宜或无法用作克隆动物核供体。这一点可能是核移植动物发生高比率的胚胎吸收、流产、出生后死亡或异常的原因之一。由于体细胞克隆动物的研究才刚刚开始,究竟哪些细胞保持完整的DNA结构还不清楚,仅有的成功率不高的报道分别来自乳腺细胞^[1]、卵丘细胞和输卵管细胞^[2,3]。此外,施主细胞的胞质作用也是选择细胞时应考虑的因素之一,因为其中的一些因子可能干扰重构胚的发育^[2],卵丘细胞由于和卵母细胞来自同一前体细胞,相容性较大,融合后较易发育^[3]。

核质的互作与协调是所有细胞正常活动的基础,核移植重构胚二倍体核型的维持及基因组再程序化的正常完成,也取决于供体核与受体卵母细胞质之间的同步协调和相互作用。这是一个更为复杂的问题,与核、质两者的功能状态及它们的相互作用是否符合细胞的发育规律有关,涉及供体细胞核的周期和卵母细胞激活与融合的时间等多个因素,在动物品种之间还存在差异。不同期核质的融合会导致细胞周期运行状态的改变,S期细胞和M期细胞杂交后会使前者发生PCC(Premature Chromosome Condensation),降低其DNA合成的水平^[25];移入MⅠ期卵母细胞的胚胎细胞也会发生PCC^[26,27]。在用胚胎细胞核移植时,G₁期的核比S期、G₂期的核能更好地发育^[14,17],S期、G₂期的细胞则只有和已激活的卵母细胞融合才能正常发育^[28]。这种差异与PCC的不同效果有关。PCC是M期细胞质中高活性的MPF(Maturation Promoting Factor)诱导产生的。S期细胞正处在DNA合成期,G₂期细胞为4倍体,如果把这两种细胞与MⅠ期卵母细胞融合,由于MPF

的作用而发生 NEBD(核膜破裂)和 PCC,然后经核重建和 DNA 再复制,染色体倍型增加,无法继续发育。相反, G_1 期细胞为二倍体,和 M I 期卵母细胞质融合后,PCC 的发生不仅不会引起细胞染色体的异常加倍^[29],还可能促进基因的再程序化^[14,27,29]。和受精卵的发育一样,核移植后卵母细胞中的母型信息只能支持短时期的发育,重构胚的后续发育依赖于再程序化后的核的驱动,母型因子存在的时间越短,给再程序化的时间越少,因而尽快完全实现再程序化是非常重要的。PCC 和与之伴随发生的 NEBD,可能会使卵母细胞质因子更易于或更快地与染色质接近而指导再程序化。M II 期卵母细胞质还能抑制移入细胞核自身的转录活性,从而使其按胞质的信息开始活动,即再程序化^[30]。激活后的卵母细胞(MPF 降解)不会使移入其中的细胞发生 PCC,细胞(包括 G_1 , S, G_2 期)仍继续原来的周期进程,保持正常核型。但如果“PCC 对基因的再程序化有促进作用”的认识^[14,27,29]是正确的话,显然激活后的卵母细胞并不是最佳胞质受体。

G_0 期细胞首先在用体外培养的胚盘细胞作核供体克隆绵羊中使用^[26],并被认为是获得产仔的主要因素。 G_0 期细胞和 G_1 期细胞一样为二倍体,拥有 G_1 期细胞在克隆胚发育中的优点。此外, G_0 期细胞由于胞质成分减少,活动性降低^[8],而可能比 G_1 期细胞更易于使细胞质因子对其染色质发挥调控作用,同时也减少了胞质对重构胚发育的干扰因素。让细胞处于 G_0 期对体细胞克隆动物是否必须,目前存在争论^[31,32],因为有人用未经休眠处理的胎儿成纤维细胞获得克隆转基因牛^[33],但作者仅确定所用细胞的 56% 为二倍体(G_1 或 G_0 期),而并未排除所用细胞处在 G_0 期的可能。所有这些有关重构胚的核质互作方面的认识,仅是试验结果的观察,并未触及深层次机理,好多方面仍没有定论,甚至有些还存在相反的报道。稳定而高效地进行动物克隆仍是一件非常困难的事。

对濒危动物进行克隆,还涉及到异种克隆的问题,所谓异种克隆是将一种动物细胞核移植到另一种动物去核卵母细胞质中。最近的研究^[5]表明,卵胞质使体细胞核去分化不具种特异性,哺乳动物异种重构胚在早期发育中,异种细胞核与细胞质间是相容的。但寄母的选择及重构胚的着床和全程发育仍是悬而未决的问题,异种克隆会有更长的路要走。

4 动物克隆的研究意义

从事科学研究的目的是,一是服务于人类自身,满足其不断增长的生活需求;二是使科学本身向前发展,取得对自然界和人类更高层次的认识。动物克隆是一项很前沿的生物学领域,对它的深入研究也具有这两个方面的意义。克隆技术潜在的经济效益是十分巨大的,它是动物育种、繁殖的新概念。应用经修饰的细胞群进行核移植,可使动物基因标定变得可行,培育出新的物种,建立重要疾病的基因模型,获得大量用于生产生物药物的动物或异种器官移植的动物;它也可用于加快良种家畜和珍稀动物的繁殖,抢救濒危动物。当然,目前看来,更具意义的是它的科学含义,让一个体细胞再重新发育成一个动物个体本身就是一件具有高度想象力并富有挑战性的事,使这一技术走向成熟的过程,包含着许许多多的科学机遇,它不仅能推动发育生物学向前发展,而且可拓展生命科学的内涵,取得对生命现象更加深入的理解。比如,细胞在逐级分化的过程中到底发生了哪些事件? 是哪些因素、通过何种机制使某种细胞的 A 基因打开、B 基因关闭? 分化细胞是怎样去分化的,需要哪些因素的调节。哪种或处于何种状态的细胞能够或易于去分化? 核质之间是通

过哪些渠道和因子发生相互作用的? 系统的研究这些问题,肯定会有一些新的发现,有一些重要规律被揭示出来,它们的影响也许会超出克隆技术本身。

[参考文献]

- [1] Wilmut I, Schnieke A E, McWhir J, et al. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells[J]. *Nature*, 1997, 385: 810~813.
- [2] Wakayama T, Perry A C F, Zuccoffi M, et al. Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei[J]. *Nature*, 1998, 394: 369~374.
- [3] Kato Y, Tani T, Sotomaru Y, et al. Eight calves cloned from somatic cells of a single adult[J]. *Science*, 1998, 282: 2095~2098.
- [4] Wells D N, Misica P M, Tervit H R. Production of cloned calves following nuclear transfer with cultured adult mural granulosa cells[J]. *Biol Reprod*, 1999, 60: 996~1005.
- [5] 陈大元, 孙青原, 刘冀琰, 等. 大熊猫供核体细胞在兔卵胞质中可去分化而支持早期重构胚发育[J]. *中国科学(C辑)*, 1999, 29(3): 324~330.
- [6] 汪堃仁, 薛绍白, 柳惠图. 细胞生物学[M]. 北京: 北京师范大学出版社, 1999.
- [7] Gurdon J B. Adult frogs derived from the nuclei of single somatic cells[J]. *Dev Biol*, 1962, 4: 256~273.
- [8] Gurdon J B, Laskey R A, Reeves O R. The developmental capacity of nuclei transplanted from keratinized skin cells of adult frog[J]. *J Emb Exp Morpho*, 1975, 34: 93~112.
- [9] 张颖清. 全息胚学说、cDNA 返接与缺失动态平衡论和全息胚定域选种法[J]. *自然杂志*, 1991, 14(8): 584~589.
- [10] Willadsen S M. Nuclear transplantation in sheep embryos[J]. *Nature*, 1986, 227: 298~300.
- [11] McGrath J S, Solter D. Inability of mouse blastomere nuclei transferred to enucleated zygotes to support development in vitro[J]. *Science*, 1984, 226: 1317~1319.
- [12] Robl J M, Prather R S, Barnes F L, et al. Nuclear transplantation in bovine embryos[J]. *J Anim Sci*, 1987, 64: 642~647.
- [13] Davor S. Lambing by nuclear transfer[J]. *Nature*, 1996, 380: 24~25.
- [14] Cheong H T, Takahashi Y, Kanagawa H. Birth of mice after transplantation of early cell-cycle-stage embryonic nuclei into enucleated oocytes[J]. *Biol Reprod*, 1993, 48: 958~963.
- [15] Otaegui P J, O'Neil G T, Campbell K H S, et al. Transfer of nuclei from 8-cell stage mouse embryos following use of nocodazole to control the cell cycle[J]. *Mol Reprod Dev*, 1994, 39: 147~152.
- [16] Campbell K H S, McWhir J, Ritchie W A, et al. Sheep cloned by nuclear transfer from cultured cell line[J]. *Nature*, 1996, 380: 64~66.
- [17] Illmensee K, Hoppe P C. Nuclear transplantation in mouse: developmental potential of nuclei from preimplantation embryos[J]. *Cell*, 1981, 23: 9~16.
- [18] Prather R S, Barnes F L, Sims M L, et al. Nuclear transfer in the bovine embryo: assessment of donor nuclei and recipient oocytes[J]. *Biol Reprod*, 1987, 37: 859~866.
- [19] Stice S L, Robl J M. Nuclear reprogramming in nuclear transplant rabbit embryos[J]. *Biol Reprod*, 1988, 39: 657~664.
- [20] Prather R S, Sims M L, First N L. Nuclear transplantation in early pig embryos[J]. *Biol Reprod*, 1989, 41: 414~418.
- [21] 张涌, 王建辰, 钱菊汾, 等. 山羊卵核移植的研究[J]. *中国农业科学*, 1991, 24(5): 1~6.
- [22] Bondioli K R, Westhusin M E, Looney C R. Production of identical bovine offspring by nuclear transfer[J]. *Theriogenology*, 1990, 33: 165~174.
- [23] Zhang Yong, Li Yuqiang. Nuclear-cytoplasmic interaction and development of goat embryos reconstructed by nuclear transplantation: production of goats by serially cloning embryos[J]. *Biol Reprod*, 1998, 58: 266~269.

- [24] Sims M L, First N L. Production of calves by transfer of nuclei from cultured inner cell mass cells[J]. *Proc Natl Acad Sci*, 1994, 91: 6143~6147.
- [25] Johnson R T, Rao P N. Mammalian cell fusion; Induction of premature chromosome condensation in interphase nuclei[J]. *Nature*, 1970, 226: 717~722.
- [26] Balakier H, Masui Y. Chromosome condensation activity in the cytoplasm of anucleated and nucleate fragments of mouse oocytes[J]. *Dev Biol*, 1986, 113: 155~159.
- [27] Collas P, Pinto-Correia C, Ponce de Leon F A, et al. Effect of donor cell cycle stage on chromatin and spindle morphology in nuclear transplant rabbit embryos[J]. *Biol Reprod*, 1992, 46: 501~511.
- [28] Campbell K H S, Ritchie W A, Wilmut I. Nuclear-cytoplasmic interactions during the first cell cycle of nuclear transfer reconstructed bovine embryos: Implications for DNA replication and development[J]. *Biol Reprod*, 1993, 49: 933~942.
- [29] Cheong H T, Takahashi Y, Kanagawa H. Relationship between nuclear remodelling and subsequent development of mouse embryonic nuclei transferred to enucleated oocytes[J]. *Mol Reprod Dev*, 1994, 37: 138~145.
- [30] Kanka J, Hozak P, Heyman Y, et al. Transcriptional activity and nucleolar ultrastructure of embryonic rabbit nuclei after transplantation to enucleated oocytes[J]. *Mol Reprod Dev*, 1996, 43: 135~144.
- [31] Wilmut I, Campbell K H S. Quiescence in nuclear transfer[J]. *Science*, 1998, 281: 1661.
- [32] Robl J M, Jerry D J, Stice S L, et al. Response[J]. *Science*, 1998, 281: 1661.
- [33] Cibelli J B, Stice S L, Golueke P J, et al. Cloned transgenic calves produced from nonquiescent fetal fibroblasts [J]. *Science*, 1998, 280: 1256~1258.

Principle and technique of animal clone

LI Yu-qiang, ZHANG Yong

(College of Animal Science and Veterinary Medicine, Northwest Science and Technology
University of Agriculture and Forestry, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: The basic principle and practice difficulty of animal clone are discussed. The theoretic basement of animal clone is that animal cell is totipotent. Since most of differentiated animal cells have all genetic information of their body, they can differentiate and recover their totipotency when injected into oocyte plasma. The maternal mRNAs and proteins of oocytes are the key factors that promote genes of injected cell to reprogram. It's very important for the reconstructed embryos to develop that the cell cycles of donor cells and recipient oocytes are synchronous and coordinate. Donor cells at G₀ phase are favorable for oocytes to regulate. All factors involved in donor cells, recipient oocytes and their interaction could affect the success of clone animal. Most of these factors are still unknown. To study these problems will not only promote animal clone efficiency, but also reveal many biological principles.

Key words: animal clone; nuclear transplantation; nuclear-cytoplasmic interaction